

液质联用快速测定中药样品中的化学药物

李 彬,赵 阳,田 瑛,董俊兴(军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850)

摘要 目的:建立快速测定中药样品中非法添加的化学药物的液相色谱-质谱联用分析方法。方法:采用串联质谱联用技术的多反应监测模式,对分属于降糖、降压、壮阳、减肥等类别的 36种中药,进行其中可能含有的格列本脲、西布曲明等 10种化学药物的定性、定量分析。结果:在 10 min 色谱未完全分离的情况下,在 36 个样品中准确地检出了 4 个降糖类样品(含格列本脲)、1 个壮阳类样品(含西地那非)、2 个减肥类样品(含西布曲明)。结论:多反应监测(MRM)模式确保了定性分析结果的专属性和定量分析的灵敏度,建立的方法可用于多种不同样品中化学药物的检验。

关键词 液质联用;非法添加化学药品;多反应监测;中药

中图分类号: R927 **文献标识码**: A **文章编号**: 1006-0111(2008)01-0017-03

Fast determination of undeclared prescription drugs in Chinese herbal medicines by LS-MS/MS

LI Bin, ZHAO Yang, TIAN Ying, DONG Jun-xing (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

ABSTRACT Objective: To build up a fast determination method for undeclared prescription drugs in Chinese herbal medicines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods:** Multiple reaction monitoring (MRM) mode was employed for the analysis of ten possible prescription drugs, including glibenclamide, sibutramine, etc, in 36 Chinese herbal medicines which were categorized into antidiabetics, antihypertensives, aphrodisiacs, weight reducers, and others, according to pharmaceutical functions. **Results:** Four antidiabetics (containing glibenclamide), one aphrodisiac (containing sildenafil) and two weight reducers (containing sibutramine) were detected within 10min even without thorough chromatographic separation. **Conclusion:** LC-MS/MS with MRM mode guaranteed sufficient specificity for qualitative analysis and sensitivity for quantitative analysis, providing an alternative for the rapid analysis of multiple undeclared prescription drugs in Chinese herbal medicines.

KEY WORDS LSMS/MS; undeclared prescription drugs; multiple reaction monitoring; Chinese herbal medicines

采用传统的液相色谱分离-紫外检测技术对中药(保健品)中添加化学药物的分析,主要依靠不同化合物的特征保留时间来完成的。引入二极管阵列检测器以后,由于可以同时提供洗脱峰的紫外光谱,一定程度上提高了定性分析的准确性。在这些方法中,化学药物的识别要求将待检化合物与体系中共存的杂质组分实现完全的分离基线,然而当体系比较复杂时,假阳性或假阴性结果将很难避免^[1,2]。

高效液相色谱-串联质谱联用技术的发展为复杂体系中微量组分的定性、定量分析提供了可能^[3,4]。根据欧盟标准 2002/657/EC 的规定^[5],应用液质联用系统进行复杂体系中微量组分(禁用药物)分析时,要达到至少 3 个识别点的要求,也即一种药物至少需要监测两个离子对,其中一对用于定

量分析,另一对用作定性验证。通过对同一化合物进行多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM),串联质谱技术可以用 MS1/MS2 对特定离子的碎片进行选择监测可以消除干扰,提高了方法建立与分析检测的速度,同时提高了测试结果的可靠性^[6]。即使液相色谱分离不完全,仍可有效避免复杂体系分析的假阳性结果。

本测定采用高效液相色谱-串联质谱联用技术(MRM 模式)对 36 种分属于降糖、降压、壮阳、减肥等多类中药样品中可能含有的格列本脲、西布曲明等 10 种化学药物进行快速筛选。

1 实验部分

1.1 仪器 API 2000 LC/MS/MS 液质联用仪, MassChrom™ 软件, TurboQuan™ 软件(美国应用生物系统 AB 公司)。

1.2 试剂、对照品与样品 甲醇、乙腈均为色谱纯(MERCK公司),水为超纯水,其余试剂为分析纯。卡托普利(captopril)、地西洋(diazepam)、地塞米松(dexamethasone)、法莫替丁(famotidine)、格列本脲(glibenclamide)、格列吡嗪(glipizide)、格列齐特(gliclazide)、布洛芬(ibuprofen)、西地那非(sildenafil)、西布曲明(sibutramine)等对照品均购自中国药品生物制品检定所。36种各类中药(保健品)固体样品由上海市食品药品监督管理局提供,按其功能类别及其对应检查的掺杂化学药物见表1。

表1 几种常见的掺杂化学药物的中药样品

| 类别 | 应检掺杂化学药 | 样品数 | 检出数 |
|------|-------------------|-----|-----|
| 降糖类 | 格列本脲、格列吡嗪、格列齐特 | 13 | 4 |
| 降压类 | 卡托普利 | 5 | 0 |
| 壮阳类 | 西地那非 | 4 | 1 |
| 减肥类 | 西布曲明 | 8 | 2 |
| 其他类别 | 地西洋、地塞米松、法莫替丁、布洛芬 | 6 | 0 |

1.3 对照品与样品处理 分别称取一定量的卡托普利等对照品,分别用甲醇配制成100 μg/mL的储备液,使用时根据需要用流动相稀释至合适浓度。

36种各类中药中,28种胶囊分别去壳,3种丸剂分别剪碎,5种片剂分别去膜,然后分别研碎、甲醇溶解、超声、离心后取上清、稀释,制得相当于0.1 mL/g中药的溶液,稀释至合适浓度进样。

1.4 液相色谱-质谱条件 分析柱为 Superspher 100 RP-18, 125 mm ×3 mm ×4 μm,预柱为 Superspher 100 RP-18, 4 mm ×4 mm (Merck AG, Darmstadt)。流动相为乙腈:水:TFA = 70:30:0.05 (v/v),流速 0.2 mL/min,柱温 30 °C,进样量 20 μL。

离子源是 TurboIonSpray (ESI),雾化气 13 mL/min,气帘气 12 mL/min,辅助加热气 6 L/min,辅助加热气温度 480 °C,碰撞气 10 mL/min。电离电压 5 kV,碰撞能 (collision energy)见表2。检测方式为多反应选择监测 (MRM),正离子(布洛芬为负离子)模式。采集 2~10 min时间区间的信号。

2 结果与讨论

在 ES正离子化方式(布洛芬为负离子)下,格列本脲生成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰 m/z 494,选择性对 $[M+H]^+$ 进行二级质谱分析,得到相对丰度依次减弱的主要碎片离子为 m/z 369、 m/z 395、 m/z 169,见表2(括弧中为分别的碰撞能)。欧盟标准 2002/657/EC规定一种药物至少需要监测两个离子对,本文选择了1个母离子与3个子离子,因此在10 min的色谱检测窗内,即使待测化学药物与中药基质的某些成分有重叠(共洗脱),也能达到准确的定性效果。

表2 待检化学药物 MRM离子

| 化学药物 | 离子 (collision energy, eV) | | | | | | LOD (ng/mL) |
|----------------------|---------------------------|----------|-----|----------|-----|----------|-------------|
| 卡托普利 (captopril) | 218 | 116 (17) | 218 | 172 (15) | 218 | 70 (35) | 0.2 |
| 地西洋 (diazepam) | 285 | 154 (36) | 285 | 193 (38) | 285 | 222 (37) | 0.1 |
| 地塞米松 (dexamethasone) | 393 | 373 (10) | 393 | 237 (22) | 393 | 279 (37) | 0.05 |
| 法莫替丁 (famotidine) | 338 | 189 (26) | 338 | 259 (15) | 338 | 155 (43) | 0.3 |
| 格列本脲 (glibenclamide) | 494 | 369 (18) | 494 | 395 (21) | 494 | 169 (38) | 0.1 |
| 格列吡嗪 (glipizide) | 446 | 321 (16) | 446 | 286 (28) | 446 | 347 (39) | 0.2 |
| 格列齐特 (gliclazide) | 324 | 127 (22) | 324 | 110 (38) | 324 | 153 (41) | 0.1 |
| 布洛芬 (ibuprofen) | 207 | 161 (13) | 207 | 119 (29) | 207 | 105 (31) | 0.2 |
| 西地那非 (sildenafil) | 475 | 58 (53) | 475 | 100 (40) | 475 | 283 (46) | 0.5 |
| 西布曲明 (sibutramine) | 280 | 139 (20) | 280 | 125 (38) | 280 | 152 (32) | 0.2 |

在定性判别时,如果某中药的 XIC 色谱图中没有出现化学药物对应的分子离子或碎片离子峰(见图 1-A),则判为阴性;相反,如果在对应的保留时间范围内,某化学药物的分子离子或碎片离子峰均出现,则可判为阳性(见图 1-B)。本实验对检测的 36 种中药样品分类,检出阳性样品 7 个(见表 1 最后一列),分别为 4 个降糖类样品(检出格列本脲)、1 个

壮阳类样品(检出西地那非)、2 个减肥类样品(检出西布曲明)。

本实验观察到的检测限可以达到 ng/g (ppt) 级别(见表 2 的最后一列,未列阳性样品的定量分析结果),这个检测限对于中药中掺杂化学药物而言已足够灵敏。

3 结论

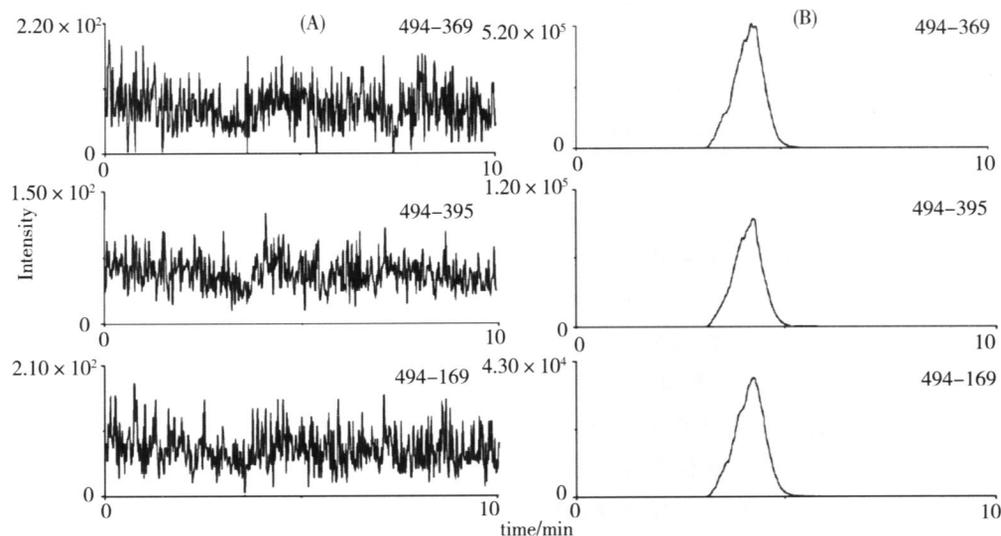


图 1 阴性样品 (A)与格列本脲阳性的减肥类中药 (B)的选择性离子流 (XIC)色谱图

本文建立的高效液相色谱-串联质谱联用技术 (MRM 模式)对 36 种分属于降糖、降压、壮阳、减肥等多类中药样品进行了快速测定,可以在 10min 内完成其中可能含有的格列本脲、西布曲明等 10 种化学药物的定性、定量分析。尽管中药样品成分复杂,10 min 内无法达到良好的色谱分离,但由于 MRM 模式确保了定性分析结果的专属性和定量分析的灵敏度,在色谱分离不够完全的情况下,仍能保证很高的定性、定量分析准确性。因而本实验建立的方法可用于多种不同样品中化学药物的检验。

当然随着化学药物非法添加的复杂性进一步提高^[7],其种类可能更多,这对一次分析完成所有可能的化学药物的检测提出了更高的要求,需要在色谱分离、MRM 结果判别、分类检测等方面做进一步的研究,才能更好地实现分析目标。

参考文献:

[1] 陈俊杰,冯军,李焕德,等. HPLC 法同时测定二甲双胍等

5 种降血糖药物 [J]. 中中药学,2003, 1(1): 34.

[2] 任志强,吴况明,龙艾兵,等. HPLC 法同时测定 3 种肾上腺皮质激素类药物及中药制剂中掺杂以上成分的快速鉴定 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(10): 1944.

[3] 胡娟,郑春松,朱新法. 减肥中成药中添加西布曲明西药成分的检测 [J]. 中国药学杂志,2006, 41(12): 945.

[4] 颜杰,程振田,马彬,等. 中药保健品中他达拉非的检测 [J]. 天津药学, 2006, 18(4): 9.

[5] The European Committee. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results [J]. Official Journal of the European Communities, 2002, 8: 8.

[6] Xing J, Xie ChF, Lou HX. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry in natural products bioanalysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(2): 368.

[7] 陆峰,乐健,陈桂良,等. 中药掺杂化学药物的分析及其对策 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1): 6.

收稿日期: 2007-03-30

(上接第 16 页)

[23] 杜全成. 中药穴位外敷治小儿哮喘 72 例 [J]. 国医论坛, 1993, (6): 26.

[24] 王爱凤,秦玉花,王惠茹,等. 血肿消口服液治疗中风病的临床疗效观察 [J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 534.

[25] 傅昌格,陈宗权,洪祥云,等. 软肝丸治疗血吸虫病肝硬化的临床研究 [J]. 湖北中医杂志, 2003, 25(1): 6.

[26] 蓝雨田. 运用几味虫类药的经验 [J]. 陕西中医函授, 1992, (4): 31.

[27] 陶汉华. 关于大黄蛰虫丸几个问题的探讨 [J]. 山东中医药大学学报, 2004, 28(6): 417.

[28] 刘焕华,于首元. 大黄磨虫丸对综合性手外伤愈合作用的研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(10): 608.

[29] 阳长明,侯世祥,罗杰英,等. 蛭螭滴眼液的工艺研究 [J]. 中成药, 2001, 23(4): 235.

[30] 张正习,胡新林. 肝硬化病中医治疗六法 [J]. 湖南中医药导报, 2002, 8(7): 405.

收稿日期: 2007-03-06